

**T IDENTIFICACIÓN DE MICOBACTERIAS NO TUBERCULOSAS AISLADAS
DE SISTEMAS DE DISTRIBUCIÓN DE AGUA POTABLE DE LA UNIVERSIDAD
DEL QUINDÍO MEDIANTE EL USO DE MÉTODOS CONVENCIONALES Y
MOLECULARES**

**FRANCY LORENA BUITRAGO PORTILLO
SANDRA MILENA RAMÍREZ HERRERA**

**TRABAJO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO FINAL PARA
OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIADAS EN BIOLOGÍA Y EDUCACIÓN
AMBIENTAL**

Director:

ARLEY GOMEZ LOPEZ MD, Msc, PhD

**UNIVERSIDAD DEL QUINDÍO
FACULTAD DE EDUCACIÓN
PROGRAMA DE LICENCIATURA EN BIOLOGÍA Y EDUCACIÓN AMBIENTAL
ARMENIA- QUINDÍO**

2006

**TA
ACEPTACIÓN**

NOTA DE

Presidente del jurado

Jurado

Jurado

Armenia- Quindío Mayo 12 de 2006

T

AGRADECIMIENTOS

Dr. Arley Gómez López, director del grupo de investigación en patogénesis molecular por darnos la oportunidad de pertenecer al grupo y por dirigirnos en este trabajo.

Sandra Milena Coronado, Clara Juliana Duran, y Nelson Enrique Arenas, asesores de este trabajo, quienes amablemente nos dirigieron y compartieron sus conocimientos.

Laura Cuervo por su colaboración en el trabajo de laboratorio.

Claudia Marcela Castro MsC, por su asistencia técnica en la interpretación de los resultados genotípicos.

Semillero de Investigación en patogénesis molecular, gracias por sus aportes y recolección de muestras.

Dr. Marco Antonio Nieto rector de la Universidad del Quindío, Dr. Jorge Enrique Gómez director del Centro de Investigación Biomédicas y la Dr. Liliana Quintero epidemióloga de la Secretaria de Salud de Armenia; por sus valiosos aportes a la corrección de este trabajo.

A todo el Centro de Investigaciones Biomédicas por toda su colaboración.

Programa de Licenciatura en Biología y Educación Ambiental.

TABLA DE CONTENIDO

1. Resumen	1
2. Introducción	3
3. Objetivos	5
3.1 General	5
3.2 Especifico	5
4. Justificación	6
5. Planteamiento	8
6. Estado del Arte	9
7. Marco Teórico	13
7.1 Breve Historia de la Clasificación de las Micobacterias	13
7.2 El Género <i>Mycobacterium</i>	14
7.3 Consideraciones Microbiológicas	17
7.4 Micobacterias No Tuberculosas (MNT)	18
7.5 Epidemiología de las MNT	19
7.5.1 <i>Mycobacterium kansasii</i>	19
7.5.1.1 Epidemiología	20
7.5.2 <i>Mycobacterium fortuitum</i>	20
7.5.2.1 Epidemiología	20
7.5.3 <i>Mycobacterium gordonae</i>	21
7.5.3.1 Epidemiología	21
7.5.4 <i>Mycobacterium scrofulaceum</i>	21
7.5.4.1 Epidemiología	22
7.5.5 <i>Mycobacterium chelonae</i>	22
7.5.5.1 Epidemiología	22
7.6 Clasificación de los Micobacterias No Tuberculosas	23
7.7 Micobacterias no Tuberculosas del medio Ambiente	24
7.8 Enfermedades Adquiridas y Especies de MNT en Sistemas de	

Distribución de Agua Potable (SDAP)	25
7.9 ¿Cómo Pueden Sobrevivir las MNT en Sistemas de Distribución de Agua Potable?	27
7.9.1 Condiciones de Crecimiento	27
7.9.2 Nutrición	28
7.9.3 Temperatura	28
7.9.4 El Papel de las Biopelículas (Biofilms)	29
7.9.5 Asociación con Protozoos	31
7.10 Identificación de MNT	31
7.10.1 Métodos Fenotípicos Convencionales	31
7.10.2 Métodos Genotípicos	32
8. Materiales y Métodos	33
8.1 Tipo de Estudio	33
8.2 Obtención de las Muestras	33
8.2.1 Toma de la Muestra	33
8.2.2 Procesamiento de la Muestra	33
8.3 Cepario	34
8.4 Identificación Fenotípica	34
8.4.1 Tiempo de Crecimiento	34
8.4.2 Producción de Pigmento	34
8.4.3 Crecimiento en Diferentes Temperaturas	35
8.4.4 Crecimiento en Diferentes Medios de Cultivo	35
8.4.5 Crecimiento en Presencia de Diferentes Sustancias Químicas	36
8.4.6 Pruebas Enzimáticas	36
8.4.7 Otras Pruebas	38
8.5 Identificación Genotípica	39
8.5.1 Extracción de ADN Genotípico	39
8.5.2 PCR	40
8.5.2.1 Cebadores	40

8.5.2.2 Mezcla de la Reacción de PCR	40
8.5.2.3 Reacción PCR	41
8.5.3 Digestión Enzimática	41
8.5.4 Gel de <i>Agarosa</i>	42
8.5.5 Documentación del Gel	42
8.5.6 Análisis de los Patrones PRA	42
8.6 Análisis Estadísticos	43
8.7 Ayuda Pedagógica	43
9. Resultados	44
10. Análisis Estadísticos	49
10.1 Análisis de Frecuencias	51
11. Análisis de Resultados	54
12. Conclusiones y Recomendaciones	58
13. Bibliografía	60
14. Anexos	73

LISTA DE TABLAS

1. Clasificación de especie <i>Micobacterianas</i> de acuerdo al riesgo para la Salud humana	16
2. Clasificación de <i>Micobacterias</i> no tuberculosas según <i>Runyon</i>	24
3. Reactivos utilizados en la mezcla de PRA para una única reacción	40
4. Relación entre el crecimiento BAAR positivo, la localización del grifo, resultados fenotípicos y genotípicos.	45
5. Especificidad de la prueba fenotípica	51
6. Frecuencia relativa y acumulativa para la identificación Fenotípica	52
7. Frecuencia relativa y acumulativa para la identificación de Genotípica	52

LISTA DE FIGURAS

1. Formación de una biopelícula en un Sistema de Distribución de Agua potable.	30
2. Fotografía del crecimiento en medio de Lowenstein Jensen de micobacterias obtenidas de muestras de agua de los grifos de la Universidad del Quindío.	46
3. Fotografía ilustrando algunas de las pruebas bioquímicas utilizadas para la identificación fenotípica de micobacterias según el protocolo del CDC de Atlanta.	47
4. Extracción de ADN genómico de la cepas MNT utilizando el método de Van Soolingen.	47
5. Amplificación del gen <i>hsp 65</i> por PCR.	48
6. Restricción del gen <i>hsp 65</i> con la enzima de restricción BstE II.	48
7. Restricción del gen <i>hsp 65</i> con la enzima de restricción Hae III.	49
8. Distribución Binomial Acumulativa inversa.	50
9. Porcentaje de las frecuencias acumulativas para la identificación fenotípica.	52
10. Porcentaje de las frecuencias acumulativas para la identificación genotípica.	53

LISTA DE ABREVIATURAS

MNT: Micobacterias No Tuberculosas

MOTT: Micobacteria Other Than Tuberculosis

MAC: Complejo *M. avium*

SDAP: Sistemas de Distribución de Agua Potable

MA: Micobacterias Ambientales

COA: Carbon Organico Asimilable

HPLC: Cromatografía Líquida de Alta Resolución

TCH: Hidracida del Acido 2 Tuiofen Carboxílico

BCG: Bacilo calmete Guerin

HA: Hidroxilamina

INH: Isoniacida

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PRA: Análisis de los patrones de Restricción

DEDICATORIA

A Dios por que me diste la fortaleza, la esperanza, el valor y la fe para luchar día a día por mis sueños.

A las tres mujeres que son el motor de mi vida y la luz de mis ojos mi madre, mi hermana y mi chiquita,

... Ustedes hicieron que este sueño se hiciera realidad con su amor, apoyo y entrega total. Las amo.

Anerol.

Agradezco a Dios la oportunidad que me ha brindado el poder culminar este peldaño en mi vida dándome la fuerza y perseverancia para seguir adelante.

A mis padres por su apoyo incondicional, su amor y colaboración.

A mis hermanos que siempre estuvieron allí para darme una mano.

Y sobre todo a la familia werling, gracias por creer en mí, por su apoyo y comprensión por que por ustedes este sueño se hace realidad.

Sandra Milena Ramírez

A todas las personas que de una u otra forma aportaron sus ideas y tiempo en la realización de este trabajo.